

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

3

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03259090 A**

(43) Date of publication of application: **19.11.91**

(51) Int. Cl

C12P 19/12
/(C12P 19/12 , C12R 1:06)

(21) Application number: **02059699**

(22) Date of filing: **09.03.90**

(71) Applicant: **MITSUBISHI KASEI CORP**

(72) Inventor: **TOMITA FUSAO**
TAKAO SHOICHI
YOKOTA ATSUSHI

(54) PRODUCTION OF DIFRUCTOSE DIANHYDRIDE
III

(57) Abstract:

PURPOSE: To continuously produce the subject compound having high thermal stability by reacting inulin with an inulinase originated from a specific microbial strain in an inulin-containing solution.

CONSTITUTION: Arthrobacter sp. (MC12496) (FERM P-11288) (strain A) is separated from natural soil. The strain forms a swollen smooth circular colony when cultured on a heart infusion agar medium at 30°C. It has

bacillar form, exhibits Gram-positive property, grows at pH5-10 and is free from starch-decomposition activity, etc. The strain A is inoculated to a medium (B) containing about 5wt.% of inulin, 0.02wt.% of yeast extract, etc., and cultured by rolling and shaking-incubation at about pH 7 and about 30°C for about 30hr at a rotational speed of 160rpm. The obtained culture produce (C) is filtered and the filtrate is concentrated, extracted and purified to obtain the objective difructose dianhydride III.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

3

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-259090

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)11月19日

C 12 P 19/12
//C 12 P 19/12
C 12 R 1:06

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ジフルクトース・ジアンヒドリドⅢの製造法

⑯ 特 願 平2-59699

⑰ 出 願 平2(1990)3月9日

特許法第30条第1項適用 平成元年9月10日、社団法人日本醸酵工学会発行の「平成元年度日本醸酵工学会大会講演要旨集」に発表

⑱ 発 明 者 富 田 房 男 北海道札幌市西区八軒三条西4丁目11-53
⑲ 発 明 者 高 尾 彰 一 北海道札幌市北区屯田二条2丁目6-2
⑳ 発 明 者 横 田 篤 北海道札幌市西区八軒三条西3丁目6-7-24
㉑ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
㉒ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ジフルクトース・ジアンヒドリドⅢの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) イヌリン含有溶液中、イヌリンをアルスロバクター・エスピー(MC12496)微工研菌寄第11288号(FERM P-11288)由来のイヌリン分解酵素と反応させることを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドⅢの製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、ジフルクトース・ジアンヒドリドⅢ(以下、「DFAⅢ」という)の製造法に関するものである。

〔従来技術及び発明が解決しようとする問題点〕

DFAⅢはフルクトース2分子が1-2', 2-3'の間で脱水縮合した構造をもつ2糖類であり、ジャクソンらにより1929年に単離同定されている[Bur. stand. J. Res. 3, 27, 1929]。

DFAⅢは、動物体内では代謝されず、非発酵

性の糖であるため低カロリー甘味剤として注目されており、今後美容食等多方面に利用されることが予想される。

ジャクソンらは、フルクトースを主成分とする多糖であるイヌリンを酸加水分解することによりDFAⅢを得ているが、収率はわずか2%弱であり、効率的な方法とは言えない。

また田中らは1972年 アルスロバクター・ウレアファシエンズの産生するイヌリン分解酵素を用いてイヌリンからDFAⅢを生成させている[Biochim. Biophys. Acta 284, 248, 1972]。

しかし本酵素は温度に対する安定性が低く、60℃を越えると急激な失活がおき、工業化を行う際に適切な酵素であるとは言えない。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らはこれらの点を解決すべく種々研究を重ねた結果、アルスロバクター・エスピー(Arthrobacter SP.) (MC12496)微工研菌寄第11288号(FERM P-11288)由来のイヌリン分解酵素が効率よくDFAⅢを生産し、

特開平3-259090(2)

しかも従来のものに比べて熱に対する安定性が高いので、工業的にDFAⅢの連続生産を行わせる際効率的に行わせることができることを知得し、本発明を完成するに至った。

即ち本発明の要旨は、インスリン含有溶液中、インスリンをアルスロバクター・エスピー(MC12496)微工研菌第11288号(FERMP-11288)由来のインスリン分解酵素と反応させることを特徴とするジフルクトース・ジアニヒドリドⅢの製造方法に存する。

以下本発明を説明するに、本発明で使用するインスリン分解酵素は、アルスロバクター・エスピー(MC12496)微工研菌第11288号(FERMP-11288)由来のものである。

本発明のアルスロバクター・エスピー(MC12496号菌)は、本発明者等により、天然土壌から分離された細菌であり、その菌学的性状は次の通りである。

1. 形態的性状

○ハートインフュージョン寒天培地上、30℃、

1 週間のコロニーの特徴

- 1) 外形 : 円形
- 2) 大きさ : 2~3mm
- 3) 表面の隆起 : 凸状
- 4) 表面の形状 : 平滑
- 5) 光沢 : 鈍光
- 6) 色調 : 黄味灰色
- 7) 透明度 : 不透明
- 8) 周縁 : 全縁

○ハートインフュージョン寒天培地上、30℃、
3~48時間培養中の形態的性質

1) 細胞形態 : 培養後6~12時間ぐらいまでは、細胞は不均一に伸長し、長い棒状になる。その後中央部に隔壁が形成され、細胞は湾曲状に曲がり、漸次分節を繰り返す。18時間以降はほとんどの細胞が短棒状の斉一な形態に変化する。

- 2) 細胞分裂様式 : Bending type
- 3) 運動性 : なし
- 4) 胞子形成 : なし
- 5) グラム染色 : 陽性

- 6) 抗酸性 : 陰性

2. 生理的性質

- 1) 嫌気条件下での生育 : 陰性
- 2) 空気中での生育 : 陽性
- 3) カタラーゼ : 陽性
- 4) オキシダーゼ : 陰性
- 5) O-Fテスト : 酸生成せず
- 6) ゼラチンの加水分解 : 陽性
- 7) リトマス・ミルク : 変色なし、
ペプトン化あり

- 8) 硝酸塩の還元 : 陰性
- 9) メチルレッドテスト : 陰性
- 10) VPテスト : 陰性
- 11) インドールの生成 : 陰性
- 12) 硫化水素の生成 : 陰性
- 13) デンプンの加水分解 : 陰性
- 14) クエン酸の利用 : 陽性
(クリスタンセン 培地上)
- 15) 無機窒素源の利用 : 陽性
- 16) ウレアーゼ : 陰性

- 17) カゼインの加水分解 : 陽性
- 18) DNaseの生産 : 陰性
- 19) 5%塩化ナトリウム中 : 陰性
での生育
- 20) 色素の生成 : 陰性
- 21) 生育温度域 : 10~37℃
- 22) 生育pH : pH5~10
- 23) Tween80の分解 : 陽性
- 24) チロシン分解性 : 陽性
- 25) 各種糖類からの酸の生成

	糖 類	MC12496
1	Ｌ-アラビノース	—
2	キシロース	—
3	ラムノース	—
4	グルコース	—
5	フルクトース	±
6	マンノース	—

(つづき有)

特開平3-259090(3)

	糖 類	M C I 2 4 9 6
7	ガラクトース	—
8	ソルボース	—
9	シュクロース	±
10	ラクトース	—
11	マルトース	—
12	トレハロース	—
13	セロビオース	—
14	ラフィノース	±
15	デキストリン	—
16	デンプン	—
17	イヌリン	±
18	グリセロール	—
19	エリスリトール	—
20	アドニトール	—
21	マニトール	—
22	ズルチトール	—

(つづき有)

	糖 類	M C I 2 4 9 6
23	ソルビトール	—
24	イノシトール	—
25	アルブシン	—
26	エスクリン	—
27	サリシン	±
28	α-メチル グルコシド	—

○培養後1～3週間観察

○+：生成能有，±：疑わしい，—：生成能無

26) 有機酸の質化性

	有 機 酸	M C I 2 4 9 6
1	酢 酸	+
2	ピルビン酸	+
3	Ｌ-乳酸	+
4	リンゴ酸	+

(つづき有)

	有 機 酸	M C I 2 4 9 6
5	コハク酸	+
6	フマル酸	+
7	α-ケトーグルタ ル酸	+
8	クエン酸	+
9	ギ 酸	+
10	プロピオン酸	+
11	酪 酸	—
12	シュウ酸	—
13	マロン酸	+
14	アジピン酸	+
15	ピメリン酸	+
16	グリコール酸	+
17	グリオキシル酸	+
18	グルコン酸	+
19	馬 尿 酸	+

(つづき有)

	有 機 酸	M C I 2 4 9 6
20	尿 酸	+
21	グルタル酸	—

○培養後1～3週間観察

○+：質化能有，—：質化能無

3. 化学分類学的性状

1) DNA中のGC含量 67%

2) 細胞壁のアミノ酸組成

モル比

リジン 1

アラニン 3

スレオニン 1

グルタミン酸 1

3) ペプチドグリカン架橋構造

Lys-Ala-Thr-Ala

または

Lys-Thr-Ala

4) 細胞壁の糖組成

特開平3-259090 (4)

ラムノース
ガラクトース

5) グリコレート・テスト

アセチル型

6) 主要メナキノン

MK-9 (H₂)

4. 分類学的考察

○属レベルの同定

本菌株 (MC12496号菌) は、

1) セル・サイクル (cell cycle) に桿状～短桿状 (Rods-coccus) の多形性を有する。

2) 絶対好気性菌である。

3) グルコース等の糖類から酸を生成しない。

4) DNA中のGC含量は67%と高いGCを示す。

5) 細胞壁のジアミノアミノ酸はリジンを有する。

6) 主要メナキノンはMK-9 (H₂) を有するなどの特徴を示す。

これらの特徴から、本菌はバージェイズ マニ

3) 細胞壁の糖としてラムノース、ガラクトースを含有する。

4) 運動性を示さない

という特徴を持っている。これらの性状と、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 第2巻及び、M. Takeuchi & A. Yokota, J. Gen. Appl. Microbiol. vol. 35:233-252, 1989 に記載されているアルスロバクター属の種の特徴と比較した結果、本菌株はアルスロバクター・アウレセンス (*Arthrobacter aureus*) に近縁な種であることが示唆された。しかし、有機酸の資化性、デンプンの加水分解等の生理的性質に違いが見られた。正式な種の帰属は、今後アルスロバクター・アウレセンスあるいは類似種と本菌との核酸レベルでの比較をした上で決定することとする。従って現段階では本菌株 (MC12496号菌) をアルスロバクター・エスピーと同定した。

さらに、DFAⅢ生産菌として公知であるアルスロバクター・グロビフォルミス (*Arthrobacter globiformis*) 及びアルスロバクター・ウレアファ

シエンス (*Arthrobacter ureafaciens*) の菌学的性状と本菌株を対比したところ、下記表に示すように架橋ペプチドの構造及び細胞壁の糖組成などの主要な点において明らかに区別された。

○種レベルの同定

アルスロバクター属菌には、現在約15種が含まれている。これらの種は、各種の生理学的性質、化学分類学的性質において識別されているが、特に細胞壁の架橋ペプチド構造、糖組成、メナキノン組成の相違が種レベルの重要な分類基準と見なされている。(K.H. Schleiber & O. Kandler, Bacteriol. Rev. Vol. 36:407-477, 1972, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2)

本菌株 (MC12496号菌) は、

1) 主要メナキノンとしてMK-9 (H₂) を含有する。

2) 細胞壁の架橋ペプチド構造はLys-Ala-Thr-Ala またはLys-Thr-Ala₂である。

シエンス (*Arthrobacter ureafaciens*) の菌学的性状と本菌株を対比したところ、下記表に示すように架橋ペプチドの構造及び細胞壁の糖組成などの主要な点において明らかに区別された。

特開平3-259090(5)

本発明においては、前記の菌を通常の微生物が利用しうる栄養物を含有する培地で培養することにより容易に増殖させることができる。栄養源としては、グルコース、水あめ、デキストリン、シュクロース、澱粉、蜂蜜、動・植物油等を使用できる。また窒素源として、大豆粉、小麦胚芽、コーンステイープリカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ、尿素等を使用できる。その他、必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、磷酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類を添加することは有効である。

本発明においては、イヌリン或いはキクイモ、ゴボウ等のイヌリン含有量の高い植物の抽出液を唯一の炭素源として含む溶液中で、上記アルスロバクター・エスピー(MC12496)微工研菌寄第11288号(FERMP-11288)由来のイヌリン分解酵素を作用させる。その際、該細菌そのものを作用させてもよいし、また、該細菌

菌名	培地の組成	培地の組成	培地の組成
MC12496	Lys-Ala-Thr-Ala またはLys-Thr-Ala	ラムノース ガラクトース	ガラクトース
7420677-5077417 (A. globiformis)	Lys-Ala	ガラクトース	ガラクトース
7420677-5077417 (A. ureafaciens)	Lys-Ala-Thr-Ala	ガラクトース	ガラクトース

菌から該酵素を抽出し、それを作用させてもよい。

細菌そのものを作用させる場合、炭素源としてのイヌリンを約1～10%含有し、その他、例えば窒素源として、大豆粉、小麦胚芽、コーンステイープリカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ、尿素等、更に必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、磷酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類等を添加した培地に本菌を接種し振とう培養を行う。この際培養温度は20～37℃が、また培養時間は12～40時間が好適である。得られた培養液を遠心分離により除菌し、その上清を加熱処理により酵素を失活させる。そして濃縮を行い、例えばこれを活性炭カラムクロマトグラフィーにより活性炭カラムに吸着させる。蒸留水でフルクトースを溶出させたあと、5%エタノール水溶液にて溶出を行う。この分画中にDFAⅢが得られるので、それを濃縮乾固すると所期のDFAⅢを得ることができる。

また酵素を作用させる場合、まず前記方法により培養を行った培養液を遠心分離により除菌し、得られたる液に硫酸(65%飽和)を加え塩析を行い、析出した沈澱物を遠心分離により取得し、少量の水に懸濁させたのち透析を行い、粗酵素液を得る。この粗酵素液を例えばpH7.0に調整した0.01～0.1Mのリン酸緩衝液中でイヌリンに作用させることによって所期のDFAⅢが得られる。

本粗酵素液は、例えばDEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650Mカラム(東ソー製)によるイオン交換クロマトグラフィーにて精製を行うことにより、電気泳動的に単一のバンドを示す酵素標品を得ることができる。本酵素標品の至適pHは5.0で、また60℃で最大活性を示した。pHは4.5～11.0の広範囲で安定であり20分間の熱処理では60℃まで安定であり高い温度安定性を示した。

〔実施例〕

以下に実施例をあげて本発明の方法をさらに具

体的に説明するが、その要旨を越えない限りこれらに限定されるものではない。

実施例 1

市販イヌリン 5%、酵母エキス 0.02%、硝酸ナトリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カリウム 0.05%、リン酸一カリウム 0.05%、塩化第二鉄 0.001% を含んだ培地 150 ml を pH 7.0 に調整して、120℃ で 20 分間蒸気滅菌した。この滅菌した溶液に、MCI 2496 号菌を一白金耳接種し、160 r.p.m. で 30℃、30 時間培養した。

培養終了後遠心分離により菌体を除去し、培養ろ液を得た。得られた培養ろ液を 10 分間加熱処理することにより酵素を失活させ、約 10 ml にまで減圧濃縮した。この液は活性炭カラム（活性炭 30g とセライト Na 535 60g の混合物を蒸留水にて充てん）に吸着させ、蒸留水 1 l を流したのち、5% エタノール水溶液で溶出した。

溶出ピークを架めて減圧濃縮にて乾固して DFA III を得た。得られた DFA III は、原料イヌリン

好にイヌリンから DFA III を生産し、また従来のものに比べて熱に対して高い安定性を有するので、DFA III の連続生産を行わせる際に非常に有効であると考えられる。

出 願 人 三 菱 化 成 株 式 会 社
代 理 人 弁 理 士 長 谷 川

ほか 1 名

特開平 3-259090 (6)

に対して 10% であった。薄層クロマトグラフィー（シリカゲルプレート（Merck 社）；展開溶媒 n-ブタノール：エタノール：水 = 2 : 1 : 1 (v/v/v)）によると、イヌリンの酸分解により得られた標準の DFA III と Rf 値 (0.67) が一致した。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養ろ液 1 ml を、5% のイヌリンを含む 0.05 M リン酸緩衝液 4 ml に加えて 30℃ で 3 時間反応させた。

反応液を加熱し酵素を失活させた後、活性炭カラムクロマトグラフィーを行い、5% エタノールにて溶出させ、溶出液を減圧濃縮にて乾固して DFA III を得た。

得られた DFA III は、原料イヌリンに対して 8.34% であった。

（発明の効果）

本発明のアルスロバクター・エスピー（MCI 2496）微工研菌第 11288 号（FERM P-11288）由来のイヌリン分解酵素は、良